

**HiGene 细胞转染试剂 C1506**  
1 ml in water (for 500 *in vitro* transfections in 24-well plates)  
常温运输, 4 °C 1 年稳定。

**HiGene 在体转染试剂 C1507**  
0.1 ml in water (for 20~30 *in vivo* transfections)  
常温运输, 4 °C 1 年稳定。

**HiGene II 细胞转染试剂 C1508**  
1 ml in water (for 500 *in vitro* transfections in 24-well plates)  
常温运输, 4 °C 1 年稳定。

**描述:** HiGene 是经过特殊交联修饰的新一代阳离子聚合物, 其高密度阳离子基团与带负电的核酸结合形成致密的纳米复合物, 通过内吞入胞。在细胞内 HiGene 有效缓冲内吞小体的 pH, 保护核酸免受降解, 并高效介导基因转运到胞浆胞核表达。HiGene 有血清转染效率更高, 并允许细胞在铺板时或铺板后立即转染, 其卓越的 *in vitro* 和 *in vivo* 转染能力堪比 jetPEI、Lipofectamine 2000、ExGen 500、FuGENE、Polyfect、SuperFect 等转染试剂。HiGene 是广谱转染试剂, 可转染的细胞包括 A497, A549, BHK, Caco-2, C-26, C2C12, C3H/10T, CHO, COS1, COS7, Sf9, HeLa, HEK293, HT-29, MCF7, NIH3T3, Jurkat, K562, RAW264.7, THP1, U937, PC12, L929, SHY-5Y, Vero, 原代神经元、原代肝细胞、皮肤成纤维细胞、人牛血管内皮细胞、单核/巨噬细胞、人胚胎干细胞等。HiGene 高效转染 siRNA 或寡聚核苷酸, 并有优异的整体动物转染能力, 介导基因在心肺肾肝脾等各种组织高效表达。

**特征:**

- ◇ 有血清转染, 转染前后可不更换培养基
- ◇ 细胞铺板时立即转染, 节省时间
- ◇ 媲美 Lipofectamine 2000, jetPEI, FuGENE
- ◇ 高效转染 siRNA、DNA、寡聚核苷酸
- ◇ *in vitro* 转染细胞谱广, 包括各种原代细胞和神经元
- ◇ *in vivo* 动物转染, 心肺肾肝脾等高效表达

**自备试剂:** 无菌 150mM NaCl 即 0.9%生理盐水或无菌蒸馏水或 PBS 缓冲液, 用于离体细胞转染制备转染混合物。5%无菌葡萄糖, 用于离体或在体转染转染混合物制备。与复合物颗粒形成有关, 勿用其它缓冲液替代。

**DNA、siRNA和寡聚核苷酸:** 建议溶于灭菌蒸馏水。质粒DNA 高纯度OD260/280 ~1.8, 无内毒素。可用内毒素清除剂(#D1501) 清除内毒素。寡聚核苷酸和用于RNA干扰(siRNA)的核苷酸, 可单独或与质粒DNA共转染, 但必须使用经HPLC或凝胶洗脱纯化去除杂链的高纯度片段。siRNA和寡聚核苷酸与DNA转染及优化操作相似, 但对其用量进行细致的优化很重要。

**细胞准备 (重要!)**

**接种细胞数:** 参见附表细胞计数接种。**培养时间:** 转染前应培养~24h, 使之处于分裂和旺盛生长期。**细胞密度与转染时机:** 培养~24h后, 细胞覆盖培养皿表面积的70~90%时为转染最佳时机。低密度细胞的转染率并不低, 但总细胞数少因而蛋白表达总量也不会很高。在较高细胞密度时转染较好, 但100%长满的细胞转染效率很低, 因此接种细胞要均匀, 以减少因局部紧密接触而致生长抑制的难转染细胞, 否则最好重头接种细胞。HiGene允许在**细胞铺板时或铺板后立即转染**, 效果与贴壁后转染相似, 但大大节省时间和劳动, 适合高通量筛选。甚至一些难转染细胞也可尝试此即时转染方法。**血清和培养基:** HiGene

具有卓越的转染能力, 血清和抗生素不影响转染, 在10~30%血清培养基转染表达效率更高。转染混合物体积为培养基的1/10, 参见表第5栏。如果培养基未明显变黄, 转染前可不更换。如转染结果满意, 转染后无需更换培养基。但转染混合物稀释了培养基, 转染4~8小时后换培养基会可进一步增加转染效率。

**HiGene和DNA用量及优化**

任何转染和优化方案需考虑转染试剂量、DNA量、但关键是二者所带的电荷比charge ratio简称R, 即转染试剂所带正电荷基团相对于核酸负电荷磷酸基团的当量比率。通常R>3时DNA复合物带正电荷可被转染。在操作上, R值规定了二者的用量比例, 适宜的R值因细胞类型和细胞密度而异。对于**离体细胞转染**, **HiGene用量和R值的计算公式如下:**

$$\text{HiGene体积}\mu\text{l} = 0.4 \times R \times \text{DNA } \mu\text{g数}$$

$$R = 2.5 \times \text{HiGene体积}\mu\text{l} \div \text{DNA } \mu\text{g数}$$

**初次转染**推荐设定R=6或8(附表灰色栏)在24孔板进行**转染优化**, 确定最佳转染方案。在DNA量固定时, 对R值的优化相当于优化HiGene用量, 建议设定R=5、7、9或者6、8、10三档。确定转染效率最高的R值后, 再优化DNA用量。附表建议的DNA量已接近所列细胞数的中上限, 但仍可~50%增减; 对难转染的巨噬细胞、原代细胞、悬浮细胞等可在较大范围增减DNA用量(0.5~5μg DNA/1×10<sup>5</sup>细胞), 再按公式计算HiGene用量。例如RAW 264.7巨噬细胞的DNA量可参照附表加倍并设R=8计算。DNA和转染试剂的量越大, 转染表达量越高, 但达到高峰后因毒性增加表达反而下降。HiGene在R<15时几乎没有细胞毒性, 因而无需为降低毒性而优化。

**贴壁细胞转染 (#C1506, 以24孔板为例, 参见表一)**

1. 参见表一第4、5栏。将1μg DNA稀释于100μl无菌生理盐水或无菌蒸馏水或PBS缓冲液(自备, 勿用其它缓冲液但可用5%葡萄糖代替), 可振荡混匀。
2. 取2.4μl HiGene加至DNA溶液, **勿用相反的加样顺序。立即振荡混匀**, 低速瞬时离心将液体甩至管底。
3. 室温放置15分钟。
4. 将100μl转染混合物直接加至1ml含血清培养基中(参见表一最右栏), 倾斜转动培养板混匀。转染前可不更换培养基。
5. 培养24~48小时检测基因表达, 或1:10传代后加抗生素筛选。转染后无需更换培养基。但转染混合物稀释了培养基, 转染4~8小时后换培养基可进一步增加转染效率。

**表一 HiGene贴壁细胞加样和优化表**

培养皿	面积 cm <sup>2</sup>	接种细胞	DNA 与稀释		HiGene 体积 μl						培养基体积 ml
			DNA μg	生理盐水或无菌蒸馏水或PBS缓冲液 μl	R=5	R=6	R=7	R=8	R=9	R=10	
96-well	0.3	1.5 × 10 <sup>4</sup>	0.25	20	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1	0.2
48-well	1	5 × 10 <sup>4</sup>	0.5	50	1	1.2	1.4	1.6	1.8	2	0.5
24-well	2	1 × 10 <sup>5</sup>	1	100	2	2.4	2.8	3.2	3.6	4	1
12-well	4	2 × 10 <sup>5</sup>	2	100	4	4.8	5.6	6.4	7.2	8	1-2
6-well 35-mm	10	4 × 10 <sup>5</sup>	3	200	6	7.2	8.4	9.6	10.8	12	2-4
60-mm 25-cm <sup>2</sup>	28	8 × 10 <sup>5</sup>	5	500	10	12	14	16	18	20	5-10
100-mm 75-cm <sup>2</sup>	75	2 × 10 <sup>6</sup>	10-15	1000	20-30	24-36	28-42	32-48	36-54	40-60	15

注计算公式: HiGene体积μl = 0.4 × R × DNA μg数

### 贴壁细胞在铺板时转染、或铺板后立即转染

1. 细胞准备：用含血清培养基洗涤消化的细胞，去除消化酶。用含血清培养基制备细胞悬液，细胞量稍大些，以转染后24h细胞生长密度达90%，或转染48h内完全长满为宜。
2. 制备转染混合物，参照表一和上述贴壁细胞转染步骤。
3. 铺板后立即转染：将细胞悬液加到培养皿中，然后立即加入HiGene-DNA转染混合物，混匀。
4. 铺板的同时转染：将HiGene-DNA转染混合物预先加到培养皿中，然后立即加入细胞悬液。
5. 培养24~48小时检测基因表达。

### 悬浮细胞转染 (#C1506)

以24孔板 Jurkat 淋巴细胞、K562 为例。

1. 按照表二准备细胞和 DNA。使用含血清培养基。通常悬浮细胞转染 HiGene 和 DNA 用量比贴壁细胞要大。初始转染推荐 R=6，随后可根据转染效率设 R=6、7、8、9、10 优化。注意 Daudi 和 Molt 4 转染 DNA 量参见表二适当再增加约 30% 并设 R=8 按公式计算 HiGene 量。
2. 悬浮细胞转染：参见贴壁细胞转染方法制备转染试剂和 DNA 混合物，室温放置 20 分钟后直接加至 1ml 含血清培养基的细胞悬液中。培养 24~48 小时进行后续实验。

表二 HiGene 悬浮细胞加样和优化表

细胞			DNA 与稀释		HiGene 体积 $\mu$ l			培养基体积
培养皿	面积 $\text{cm}^2$	接种细胞	DNA $\mu$ g	生理盐水或无菌蒸馏水或 PBS 缓冲液 $\mu$ l	R=6	R=8	R=10	
96-well	0.3	$3 \times 10^4$	0.3	20	0.72	0.96	1.2	0.2 ml
48-well	1	$1 \times 10^5$	0.8	50	1.92	2.56	3.2	0.5 ml
24-well	2	$2 \times 10^5$	1.5	100	3.6	4.8	6	1 ml
12-well	4	$4 \times 10^5$	3	100	7.2	9.6	12	1-2 ml
6-well 35-mm	10	$1 \times 10^6$	6-12	200	14.4	19.4	24	2-4 ml
60-mm 25- $\text{cm}^2$	28	$2 \times 10^6$	10-20	500	24	32	40	5-10 ml
100-mm 75- $\text{cm}^2$	75	$6 \times 10^6$	30-60	1000	72	96	120	10-15 ml

注：计算公式  $\mu$ l of HiGene =  $0.4 \times R \times \mu$ g DNA

### 动物在体 in vivo 转染 (#C1507)

HiGene对血清不敏感，可高效介导DNA、siRNA、寡聚核苷酸的在体转染和表达。推荐初始转染R=6。在肺和脾脏表达最高。优化可使特定器官和组织的转染表达水平提高数倍至数十倍。优化时设R=6、7、8、9、10，参考表三和表四的DNA量，按公式计算HiGene用量： $\mu$ l of HiGene =  $0.02 \times R \times \mu$ g of DNA

表三 动物in vivo转染DNA和HiGene用量 (R=6)

$\mu$ g, DNA	1	5	10	20	30	50	60	70	100
$\mu$ l, HiGene	0.12	0.6	1.2	2.4	3.6	6	7.2	8.4	12

表四 动物in vivo转染参照表

	注射部位	$\mu$ g DNA/siRNA	$\mu$ l of HiGene R=6	$\mu$ l of HiGene R=8	注射体积 $\mu$ l
小鼠	尾静脉	50 (40-70)	6	8	400

小鼠	腹腔	120 (100-200)	14.4	19.2	1000
小鼠	皮下	5	0.5	0.8	15
小鼠	脑	2.5	0.25	0.4	5
大鼠	静脉	150 (150-300)	18	25.6	1~1.5 ml
小鼠	脑	4	0.48	0.64	8

### 动物in vivo转染步骤

小鼠总量DNA在50-70 $\mu$ g较好，>50 $\mu$ g表达增加不明显但毒性增加，超过100 $\mu$ g部分动物可能死亡。注射混合物中DNA浓度应<0.5 $\mu$ g/ml。由于离子强度影响复合物大小，DNA和HiGene稀释于5%葡萄糖溶液的效果比稀释于生理盐水或无菌蒸馏水或PBS缓冲液好。另外有研究认为小鼠静脉注射用400 $\mu$ l体积最佳。

1. 50 $\mu$ g DNA稀释于200 $\mu$ l 5%无菌葡萄糖液(自备，勿用其它替代)，振荡混匀。
2. 稀释6  $\mu$ l HiGene于200 $\mu$ l 5%葡萄糖，振荡混匀。
3. 将稀释的HiGene加至DNA溶液(顺序勿反)，立即振荡混匀。低速瞬时离心将液体甩至管底。
4. 室温放置20分钟。
5. 动物注射。24~48小时检测。